

BUNDESPUBLIK DEUTSCHLAND

10/521584

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 12 AUG 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 32 778.5

**Anmeldetag:** 18. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:** BASF Aktiengesellschaft,  
Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase  
als Target für Herbizide

**IPC:** C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 03. Juli 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Jerofsky

## NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase als Target für Herbizide

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase (E.C. 1.6.2.2), welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt, und

10 durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 oder funktionelle Äquivalente der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz codiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1 bereitgestellt. Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung des Polypeptides

15 mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung, welche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase inhibieren. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als

20 Herbizide.

Das grundlegende Prinzip, Herbizide über Inhibierung eines definierten Targets zu identifizieren ist bekannt (z.Bsp. US 5,187,071, WO 98/33925, WO 00/77185). Generell besteht ein großer

25 Bedarf, Enzyme zu detektieren, welche neue Targets für Herbizide darstellen könnten. Gründe hierfür sind auftretende Resistenzproblematiken von an bereits bekannten Targets wirkenden herbiziden Wirkstoffen und das ständige Bemühen neue herbizide Wirkstoffe zu identifizieren, die sich durch einen möglichst breiten Wirkungsbereich, ökologische und toxikologische Verträglichkeit und/oder

30 geringe Aufwandmengen auszeichnen.

Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines Stoffwechselweges ist, häufig das Wachstum der

35 Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen, dass die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Existenz nicht bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht limitierend für den Stoffwechselweg ist. Ferner zeichnen sich

40 pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz aus. Im Genom von Arabidopsis thaliana liegen funktional äquivalente Enzyme im Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamilien vor (Nature, 2000, 408(6814):796-815). Diese Annahme wird experimentell bestätigt durch die Tatsache, dass grosse Gen-

45 Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in Ara-

bidopsis bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als erwartet (Curr. Op. Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, neue  
5 Targets zu identifizieren, die für das Wachstum von Pflanzen essentiell sind bzw. deren Inhibierung für die Pflanze zu einem verminderten Wachstum führen, sowie Verfahren bereitzustellen, welche zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung geeignet sind.

10

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

20

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz;
- b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID  
20 NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt;
- c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das  
25 eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt; oder
- d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1.

als Target für Herbizide.

35

An dieser Stelle werden nun weitere der in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

40

"Affinitäts-Tag": Bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen kodierende Nukleinsäuresequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz direkt oder mittels eines Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient zur Isolierung, Anreicherung und/oder gezielten Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins mittels Affinitäts-Chromatographie aus Gesamtzellextrakten. Der oben erwähnte Linker kann vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder  
45 Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf vom Zielprotein abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag" z.B. von Quiagen, Hilden, "Strep-

Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer Chitin bindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, das Maltose-bindende Protein (pMal) von New England Biolabs und das sogenannte CBD-Tag von Novagen. Der Affinitäts-Tag  
5 kann dabei am 5'- oder 3'-Ende der kodierenden Nukleinsäuresequenz mit der für das Zielprotein kodierenden Sequenz angebracht sein.

"Antisense- oder Cosuppressions-Technik" beschreibt Technologien  
10 zur Suppression (Verringerung) der Genexpression, worin ein Gen kodierend für einen im jeweiligen Experiment zu definierenden Teil eines zu supprimierenden natürlichen Gens in "sense" oder "antisense" Orientierung unter Kontrolle eines geeigneten Promotors in eine Modellpflanze transformiert wird. Die auf diese  
15 Weise erzeugten transgenen Pflanzen weisen in der Regel eine unterschiedlich stark ausgeprägte Suppression der Transkription des natürlichen Gens auf, die mit geeigneten Methoden nachgewiesen werden kann. Diese Technik erlaubt somit, die Auswirkungen eines in seiner Expression reduzierten Gens auf einen Organismus zu  
20 studieren (zur Übersicht siehe Trends in Plant Science, 2000, 5(9), 394-396).

"Expressionskassette": Eine Expressionskassette enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Kontrollelement, wie einem Promotor,  
25 sowie vorteilhaft mit einem weiteren Kontrollelement, wie einem Terminator. Die Nukleinsäuresequenz der Expressionskassette kann beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische  
30 Analoga davon sein. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extra-chromosomal oder integriert in das Genom vorliegen. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten,  
35 sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Auch artifizielle Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression eines durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung des von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.  
40  
45

Alle vorstehend erwähnten Nukleotid-Sequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragment-Kondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

"Funktionelle Verknüpfung": Unter einer funktionellen oder operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung regulativer Sequenzen bzw. genetischer Kontrollelemente derart, daß jede der regulativen Sequenzen bzw. jedes der genetischer Kontrollelemente ihre Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

"Funktionelle Äquivalente" beschreiben hier Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 oder Teilen der SEQ ID NO:1 hybridisieren und befähigt sind, die Expression eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.

Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10-50 bp, vorzugsweise 15-40 bp beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einer Länge von 100-500 bp oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure/Oligonukleotid, der Länge des Fragmentes oder der vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart, d.h. DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen

## 5

für DNA:DNA-Hybride ca 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je  
5 nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen  
10 die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C.  
15 Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbü-  
20 chern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybri-  
25 disierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Es-  
30 sential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

- Unter einem funktionellen Äquivalent der SEQ ID NO:1 versteht man weiterhin auch Nukleinsäuresequenzen die mit der SEQ ID NO:1 bis  
35 zu einem definierten Prozentsatz homolog bzw. identisch sind und ferner insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodieren.

40

Es werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen erhält. Beispiels-  
haft können solche Modifikationen durch dem Fachmann geläufige

-- 45 Techniken, wie "Site Directed Mutagenesis", "Error Prone PCR", "DNA-shuffling" (Nature 370, 1994, pp.389-391) oder "Staggered Extension Process" (Nature Biotechnol. 16, 1998, pp.258-261) er-

zeugt werden. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Einfügung weiterer Restriktionsenzymchnittstellen, die Entfernung von DNA zur Verkürzung der Sequenz, der Austausch von Nukleotiden zur Codon-Optimierung oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen sein. Proteine, die über modifizierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, müssen trotz abweichender Nukleinsäuresequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.

Der Begriff des funktionellen Äquivalents kann sich auch auf das durch die entsprechende Nukleinsäuresequenz kodierte Aminosäuresequenz beziehen. In diesem Fall beschreibt der Begriff funktionelles Äquivalent ein Protein, dessen Aminosäuresequenz mit der SEQ ID NO:2 bis zu einem definierten Prozentsatz identisch bzw. homolog ist.

Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

"Genetische Kontrollsequenz" beschreibt Sequenzen, die einen Einfluss auf die Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen haben. Beispiele hierfür sind Promotoren, Terminatoren oder sogenannte "enhancer" Sequenzen. Zusätzlich zu diesen Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des Zielgens modifiziert, also erhöht oder erniedrigt wurde. Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, sowie die Chromatinstruktur beeinflussende Sequenzen (z.B. Matrix attachment regions (MAR's)) die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135), Kälte- und Trockenstress

(Plant Cell 1994, (6): 251-264) und Hitzestress (Molecular & General Genetics, 1989, 217(2-3): 246-53) beschrieben.

5 "Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge der kürzeren der beiden Sequenzen definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.2 Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA) unter Einstellung  
10 folgender Parameter für Polypeptide

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

15 und folgender Parameter für Nukleinsäuren

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

Average Match: 10.000

Average Mismatch: -0.000

20 berechnet wird.

Anstelle des Begriff "homolog" oder "Homologie" wird im Folgenden auch gleichbedeutend der Begriff Identität verwendet.

25 "Mutationen" von Nuklein- oder Aminosäuresequenzen umfassen Substitutionen (=Ersetzungen), Additionen (Hinzufügung), Deletionen (Löschung), Inversion (Veränderungen) oder Insertionen (Einfügungen) eines oder mehrerer Nukleotidreste, wodurch sich auch die entsprechende Aminosäuresequenz des Zielproteins mittels Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren  
30 verändern kann, wobei jedoch insgesamt die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins im wesentlichen beibehalten werden.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus. Im Fall einer genomischen  
35 Bibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an 5'- oder 3'-Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 100 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp,  
40 ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 bp.

"Pflanzen" im Sinne der Erfindung sind Pflanzenzellen, -gewebe,  
.. 45 -organe oder ganzen Pflanzen wie Samen, Knollen, Blüten, Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel oder sonstige Pflanzenteile zu verstehen. Außerdem ist unter Pflanzen Vermehrungsma-



terial wie Samen, Früchte, Sämlinge, Stecklinge, Knollen, Schnitte oder Wurzelstöcke zu verstehen.

"Reaktionszeit" bezeichnet die Zeit, die man für die Durchführung eines Aktivitätstests bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine Aktivität benötigt und hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf photometrischen Methoden basierenden Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung liegen die Reaktionszeiten beispielsweise im allgemeinen zwischen > 0 bis 120 Minuten.

"Rekombinante DNA" beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen herstellbar durch rekombinante DNA-Technologie.

"Rekombinate DNA-Technologie": allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (z.B. beschrieben in Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

"Replikationsursprünge" gewährleisten die Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen und Hefen z.B. der pBR322 ori oder der P15A ori in E. coli (Sambrook et al.: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und der ARS1 ori in Hefe (Nucleic Acids Research, 2000, 28(10): 2060-2068).

"Reportergene" kodieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Gerdes HH and Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389(1):44-47; Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffell SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luziferase (Giacomin, Plant Sci 1996, 116:59-72; Scikantha, J Bact 1996, 178:121; Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414), sowie Luziferasegene, im allgemeinen die  $\beta$ -Galactosidase oder die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das Ura3-Gen.

"Selektionsmarker" verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika, oder andere toxische Verbindungen: Beispielhaft zu nennen seien hier das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin, 5 Paromycin (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das sul Gen kodierend für eine mutierte Dihydropteroat Synthase (Guereineau F et al., Plant Mol Biol. 1990; 15(1):127-136), das Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193) und das shble Resistenzgen, das eine Resistenz gegen die Bleomycin 10 Antibiotika wie z.B. Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für Selektionsmarker-Gene sind Gene, die eine Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinotricin etc. verleihen oder solche, die eine Antimetaboliten-Resistenz verleihen, zum Beispiel das dhfr-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 15 13 (1994) 142-149). Geeignet sind ferner Gene wie trpB oder hisD (Hartman SC and Mulligan RC, Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8047-8051). Geeignet ist auch das Gen der Mannose-Phosphat Isomerase (WO 94/20627), das ODC (Ornithin-Decarboxylase) Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Bio- 20 logy, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.) oder die Deaminase aus Aspergillus terreus (Tamura K et al., Biosci Biotechnol Biochem. 59 (1995) 2336-2338).

"Transformation" beschreibt einen Prozess zur Einführung hetero- 25 loger DNA in eine pro- oder eukaryontische Zelle. Mit einer transformierten Zelle ist nicht nur das Produkt des Transformationsprozesses an sich beschrieben, sondern auch alle transgenen Nachkommen des durch die Transformation hergestellten transgenen Organismus

30 "Target/Target Protein": ein Polypeptid codiert über die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, welches ein Enzym im klassischen Sinne sein kann oder z.B. ein Strukturprotein, ein für Entwicklungsprozesse relevantes Protein, Regulationsproteine wie Trans- 35 kriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Untereinheiten von Kanälen, Transportproteine, regulatorische Untereinheiten die einem Enzymkomplex eine substrat- oder Aktivitätsregulation verleihen. Allen Targets oder Wirkorten gemein ist dabei, dass deren funktionale Anwesenheit essentiell für das Überleben 40 oder die normale Entwicklung und das Wachstum sind.

"Transgen": Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette oder einen Vektor enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit der 45 vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor beschreibt der Ausdruck transgen alle solche durch gentechnische Methoden hergestellten Konstruktionen, in denen

sich entweder die Nukleinsäuresequenz des Zielproteins oder eine mit der Nukleinsäuresequenz des Zielproteins funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der vorstehend genannten Möglichkeiten sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden. Die Modifikation kann hier beispielsweise über Mutation eines oder mehrerer Nukleotidreste der entsprechenden Nukleinsäuresequenz erreicht werden.

- 10 Die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 codiert für eine spezifisch von NADH abhängige Cytochrom b5 Reduktase (E.C. 1.6.2.2).

Charakteristisch für höhere Eukaryoten ist das an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisierte Elektronen-Transfersystem besteht aus einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase und Cytochrom b5 (Cytb5). Die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase überträgt mit einem FAD als prosthetischer Gruppe dabei Elektronen von NADH auf Cytb5, ein Häm-haltiges Protein.

- 20 In Pflanzen wurde Cytb5 als Komponente des Elektronentransports bei der Modifikation von Fettsäuren beschrieben (Kearns et al, 1991; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, Seite 751). Vermutlich werden die Elektronen anschließend von Cytochrom b5 weiter auf Desaturasen oder P450 Monooxygenasen übertragen (Fukuchi-Mizutani, Plant Physiology, 119; 353-361; 1999).  
25 Pflanzliche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktasen werden in nahezu allen Zelltypen gefunden, insbesondere in unreifen Samen (Fukuchi-Mizutani, Plant Physiology, 119; 353-361; 1999).

- Erstmals isoliert und charakterisiert wurde die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus menschlichen Erythrozyten (Yubisui T, Takeshita M., J Biol Chem., 1980;255(6):2454-1456) und seitdem auch aus vielen anderen Organismen. Bekannt sind Nukleinsäuresequenzen pflanzlicher NADH-abhängiger Cytochrom b5 Reduktasen  
35 z.B. aus Arabidopsis (Gen Bank Acc. No. AB007799; Mizutani und Fukuchi-Mizutani, Plant Physiol. 119, 353-361; 1999) sowie ESTs pflanzlicher NADH-abhängiger Cytochrom b5 Reduktasen aus Medicago truncatula (Gen Bank Acc. No. AA660929; Covitz, P.A. et al. Plant Physiol. 117 (4), 1325-1332 (1998) Identität zur Seq ID NO:1 =  
40 68.763%, Identität mit SEQ ID NO:2 = 46,897%), Oryza sativa (Gen Bank Acc. No. BE039960; Identität zur Seq ID NO:1 = 69.457%, Identität mit SEQ ID NO:2 = 75,912%), Solanum tuberosum (Gen Bank Acc. No. BE340917, Identität zur Seq ID NO:1 = 75.564%, Identität mit SEQ ID NO:2 = 81,675%) und Beta vulgaris (Gen Bank Acc. No.  
45 BI096337; Identität zur Seq ID NO:1 = 52.727%; Identität mit SEQ ID NO:2 = 39,552%) und Kürbis (Cucurbita maxima; Gen Bank Acc. No. AF274589; Identität mit SEQ ID NO:1=56.703%, Identität

mit SEQ ID NO:2 =43.621%).

NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus menschlichen Erythrozyten kann durch millimolare Konzentrationen von Inositol Hexaphosphat gehemmt werden (Palmieri et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1990, 280(1), 224-228). Thenoyltrifluoracetone zeigt bei 0.5 mM eine 50%ige Hemmung der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus Rattenleber-Mikrosomen (Golf et al, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1985, 366, 647-653). Weitere Substanzen, die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus verschiedenen Organismen hemmen können, sind Amytal, Mepacrin, Dicoumarol (Golf et al; 1985, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366, pp. 647-653), oder N-Ethylmaleimide und Atebrin (Tamura et al; 1983, J. Biochem. 94, pp. 1547-1555). Inhibitoren für pflanzliche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktasen wurden jedoch bisher nicht beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass Pflanzen, in denen gezielt die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase verringert wurde, Phänotypen aufwiesen, die mit durch Herbizidapplikation erzeugten Phänotypen vergleichbar sind. Beobachtet wurden Wachstumsretardierungen und nekrotische, gestresste Blätter sowie in einigen Fällen das Absterben ganzer Pflanzen oder von Pflanzenteilen. Die Schoten dieser Pflanzen waren entweder leer oder enthielten verkümmerte Samen, die allesamt nicht in der Lage waren, zu keimen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von einem Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz;
- 35 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;
- 40 c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt; oder

d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1;

5 als Target für Herbizide. Die funktionellen Äquivalente gemäß c) zeichnen sich durch eine im wesentlichen gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die physiologische Funktion einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase.

10 Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:1 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:1 von mindestens 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% vorzugsweise mindestens 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und 70% bevorzugt mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76% besonders bevorzugt mindestens 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% ganz besonders bevorzugt mindestens 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2  
20 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:2 von mindestens 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% vorzugsweise mindestens 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und 70% bevorzugt mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%,  
25 83%, 84%, 85%, 86% besonders bevorzugt mindestens 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% ganz besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Weiterhin werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung funktionelle Äquivalente der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen beansprucht, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodieren, enthaltend einen Teilbereich umfassend:

35 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID  
40 NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 77% zu der SEQ ID NO:3.

.. 45 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine

## 13

Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

Ebenfalls beansprucht werden die durch die vorstehend genannten 5 Nukleinsäuresequenzen kodierten Polypeptide. Die funktionelle Äquivalente zeichnen sich durch eine im wesentlichen gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die physiologische Funktion einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase.

- 10 Der Begriff "umfassend" oder "umfassen" bezogen auf Nukleinsäuresequenzen meint, daß die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz am 3' oder am 5' Ende zusätzliche Nukleinsäuresequenzen enthalten kann, wobei die Länge der zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen 75bp am 5' und 50bp 3' Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, vorzugsweise 50bp am 5' und 10bp am 3' Ende nicht überschreitet.

- Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:3 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 77%,  
20 78%, 79%, 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% besonders bevorzugt mindestens 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

- Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:4  
25 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:4 von mindestens 87% vorzugsweise mindestens 88%, 89%, 89% bevorzugt mindestens 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96% ganz besonders bevorzugt mindestens 97%, 98%, 99% auf.

- 30 Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bestehend aus

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder  
35  
b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder  
40  
c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt; oder  
45

## 14

- d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder

5 Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase enthaltend einen Teilbereich umfassend:

- 10 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

- c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 86% zu der SEQ ID NO:3; oder

- 20 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt;

25

werden im folgenden als "erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen" bezeichnet. Die durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase werden im folgenden der Einfachheit halber als "NCR" bezeichnet.

- 35 Methoden reduziert wird. Verglichen wird eine derartig modifizierte Pflanze mit einer Pflanze, die bezüglich dieses Polypeptides keine genetischen Modifikationen aufweist, ansonsten aber mit dem Genotyp der genetisch manipulierten Pflanze identisch ist unter identischen Wachstumsbedingungen.

40

Die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue Targets für Herbizide dar, welche die Bereitstellung neuer Herbizide zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen ermöglichen.

45

## 15

Unter unerwünschten Pflanzen sind im weitesten Sinne alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind, zum Beispiel:

- 5 Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*,  
10 *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, *Taraxacum*.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*,  
15 *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*.

- 20 Die SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 oder Teile der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen können für die Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet werden, über welche z.B. die entsprechenden Vollängengene und/oder funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 isoliert werden können. Die Herstellung dieser Sonden sowie die Durchführung der Experimente ist bekannt.  
25 Sie kann zum Beispiel über die gezielte Herstellung radioaktiver oder nicht radioaktiver Sonden mittels PCR und der Verwendung von entsprechend markierten Oligonukleotiden mit anschließenden Hybridisierungsexperimenten erfolgen. Die hierfür  
30 erforderlichen Technologien sind beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) aufgeführt. Die entsprechenden Sonden können weiterhin mittels Standardtechnologien (Lit. SDM bzw. random Mutagenesis)  
35 so modifiziert werden, dass sie für weitere Zwecke eingesetzt werden können, z.B. als Sonde, die spezifisch zu mRNA sowie den entsprechenden codierenden Sequenzen hybridisiert zwecks Analyse der entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen.

- 40 Des weiteren können die oben genannten Sonden für die Detektion und Isolation von funktionellen Äquivalenten der SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 aus anderen Pflanzenspezies aufgrund von Sequenzidentitäten verwendet werden. Hierbei wird ein Teil oder die gesamte Sequenz der entsprechenden SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 als Sonde  
45 zum Screening in einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Pflanzenspezies oder in einer Computer-Recherche nach Se-



16

quenzen funktioneller Äquivalente in elektronischen Datenbanken verwendet.

Bevorzugte Pflanzenspezies sind hierbei die bereits eingangs erwähnten unerwünschten Pflanzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Expressionskassetten enthaltend

- 10 a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz umfassend einen Teilbereich enthaltend eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 86% zu der SEQ ID NO:3; eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt;
- 20
- b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- 25 c) eine Kombination aus a) und b);

sowie die Verwendung von Expressionskassetten enthaltend

- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz;
- b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- 35 c) eine Kombination aus a) und b);

zur Expression einer NCR, die in "in vitro" Testsystemen verwendet werden kann. Beide Ausführungsformen der vorstehend beschriebenen Expressionskassetten werden im folgenden als erfindungsgemäße Expressionskassette bezeichnet.

40

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette am 5'-Ende der kodierenden Sequenz einen Promotor und am 3'-Ende Transkriptions-Terminations-Signal und gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, welche mit

45

der dazwischenliegenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft sind.

Unter den erfindungsgemäßen Expressionskassetten sind auch Analoga zu verstehen, die zum Beispiel durch eine Kombination der einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Kotransformation) oder durch sequenzielle Transformation zustande kommen können.

10

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen nach Punkt a) für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder für Vektoren enthaltend erfindungsgemäße Expressionskassetten sind beispielsweise Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*,  $\lambda$ -PR- oder im  $\lambda$ -PL-Promotor, die zur Expression der NCR in gram-negativen Bakterienstämmen verwendet werden können.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren *amy* und *SPO2*, die zur Expression der NCR in gram-positiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotoren *AUG1*, *GPD-1*, *RX6*, *TEF*, *CUP1*, *PGK*, *GAP1*, *TPI*, *PHO5*, *AOX1*, *GAL10/CYC1*, *CYC1*, *OliC*, *ADH*, *TDH*, *Kex2*, *MFa* oder *NMT* oder Kombinationen der vorstehend genannten Promotoren (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Romanos et al. Yeast 1992 Jun; 8(6):423-88; Benito et al. Eur. J. Plant Pathol. 104, 207-220 (1998); Cregg et al. Biotechnology (N.Y.) 1993 Aug; 11(8):905-10; Luo X., Gene 1995 Sep 22; 163(1):127-31; Nacken et al., Gene 1996 Oct 10; 175(1-2): 253-60; Turgeon et al., Mol Cell Biol 1987 Sep; 7(9):3297-305) oder den Transkriptionsterminatoren *NMT*, *Gcy1*, *TrpC*, *AOX1*, *nos*, *PGK* oder *CYC1* (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Brunelli et al. Yeast 1993 Dec 9(12): 1309-18; Frisch et al., Plant Mol. Biol. 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., Biotechnology (N.Y.) 12 (2), 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number : AF049064; Punt et al., (1987) Gene 56 (1), 117-124) enthalten, die zur Expression der NCR in Hefestämmen verwendet werden können.

Als zur Expression in Insektenzellen geeignete genetische Kontrollsequenzen sind exemplarisch der Polyhedrin-Promotor sowie der *p10*-Promotor (Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1988) Bio/Techn. 6, 47-55) zu nennen.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der NCR in Zellkultur sind neben Polyadenylierungssequenzen wie z.B. aus Simian Virus 40 eukaryontische Promotoren viralen Ursprungs

wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression  
5 der NCR in Pflanzen sind in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S  
[Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant.  
Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, LEB4, USP, STLS1, B33, NOS;  
FBPaseP (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor  
10 enthalten, vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanz-  
lichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus ent-  
stammt. Insbesondere bevorzugt sind Promotoren viralen Ursprungs  
wie der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus  
(Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294; Odell et al., Nature 313  
(1985), 810-812). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind  
15 zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium,  
der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus  
Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant  
Mol Biol 1995, 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase  
Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus  
20 Weizen (WO 91/13991).

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren  
Promotor als genetische Kontrollsequenz enthalten, durch den die  
Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten  
25 Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B.  
der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993),  
361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein  
durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch  
Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,  
30 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw.  
ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334)  
Promotor können ebenfalls verwendet werden.

Geeignet sind ferner Promotoren die eine gewebe- oder organspezi-  
35 fische Expression z.B. in Antheren, Ovarien, Blüten und Blütenor-  
ganen, Blättern, Schließzellen, Trichomen, Stengel, Leitgeweben,  
Wurzeln und Samen vermitteln. Ebenfalls geeignet sind hier neben  
den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere solche  
Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten.  
40 Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartof-  
fel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco  
(Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor  
aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).  
Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen  
45 und pflanzlichen Embryonen steuern. Samenspezifische Promotoren  
sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bu-  
stos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumingens

(Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen Genet 1991, 225: 121-128; Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090).

- 10 Weitere als genetische Kontrollsequenzen geeignete Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Spore-
- 15 min Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blüten-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase
- 20 Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nr U87999)
- 25 oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

- Unter zusätzlichen Funktionselementen b) sind beispielhaft aber nicht einschränkend Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und sogenannte Affinitäts-Tags, fusioniert mit der
- 30 NCR direkt oder mittels eines Linkers optional enthaltend eine Protease-Schnittstelle zu verstehen. Weitere geeignete zusätzliche Funktionselemente sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Peroxisom, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

- 40 Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten.

- Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fach-
- 45 mann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu

verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

- 5 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus  
10 einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt als Vektor oder den verwendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen.

- Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind  
15 genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

20

- Die erfindungsgemäße Expressionskassette sowie davon abgeleitete Vektoren können zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen und eukaryontischen, nicht humanen Zellen (z.B. Insektenzellen) mit dem Ziel der rekombinan-  
25 ten Herstellung der NCR eingesetzt werden, wobei sich die Herstellung einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchen das Gen exprimiert werden soll, richtet.

- In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die im  
30 erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- Sollen neben den Nukleinsäuresequenzen weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen in einem  
35 einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

- Hierbei kann das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), der Expressionskassette oder des Vektors in die entsprechenden Organismen (Transformation) prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.  
40

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den  
45 Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) "Current protocols in molecular biology",

John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.

Für dikotyle Pflanzen können die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden. Geeignete Methoden sind das biolistische Verfahren oder durch Protoplastentransformation (vergl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec.Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben.

Die Transformation mittels Agrobakterien sowie die für die Transformation zu verwendenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (; Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187) , EP A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblisserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287).

45 Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobacterium basierender Vektoren wurde beschrieben ( Chan et al, Plant Mol. Biol. 22(1993), 491-506; Hiei et al, Plant J. 6 (1994)

## 22

- 271-282; Deng et al; Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al, Plant Cell Reports 11, (1992) 76-80; May et al; Biotechnology 13 (1995) 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992) 550-555; Ritchie et al; Transgenic Res. (1993) 5 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux; Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al; Biotechnology 11 (1992), 667-674; Ritala et al, Plant Mol. Biol 24, (1994) 317-325; Spencer et al, Theor. Appl. Genet. 79 10 (1990), 625-631) die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen ; die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0513849 A1; EP 0465875 A1; EP 0292435 A1; Fromm et al, Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al, Plant Cell 2 (1990); 603-618; Koziel et al, Biotechnology 11 (1993) 194-200; Moroc et al, Theor Applied Genetics 80 (190) 721-726). Bei der Transformation von filamentösen Pilzen bieten sich zum einen die Herstellung von Protoplasten und Transformation mit 20 Hilfe von PEG (Wiebe et al. (1997) Mycol. Res. 101 (7): 971-877; Proctor et al. (1997) Microbiol. 143, 2538-2591), zum anderen die Transformation unter zur Hilfe nahme von Agrobacterium tumefaciens (de Groot et al. (1998) Nat. Biotech. 16, 839-842) an.
- 25 Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben z.B. für Gerste ( Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al, s.o.; Weizen ( Nehra et al, Plant J. 5 (1994) 285-297).
- 30 Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, 35 Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- 40 Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

## 23

Die durch Transformation mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen einer Expressionskassette, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Vektor, enthaltend die vorstehend genannte Expressionskassette, hergestellten transgenen Organismen sowie die mittels Expression aus dem transgenen Organismus erhältliche rekombinante NCR sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von transgenen Organismen enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionskassette z.B. für die Bereitstellung rekombinanter Proteins und/oder die Verwendung dieser Organismen in in vivo Testsystemen.

Bevorzugte Organismen für die rekombinante Expression sind neben Bakterien, Hefen, Moose, Algen, Pilze auch eukaryontische Zelllinien.

Bevorzugte Moose sind *Physcomitrella patens* oder weitere in Kryptogamen, Bd.2, Moose, Farne, 1991, Springer Verlag (ISBN 3540536515), beschriebene Moose.

Innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystis* oder *Anabena* bevorzugt.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*, oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) beschriebene Pilze.

Bevorzugte Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Brassicaceae wie Raps, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlrarten oder Canola; Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika; Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula; Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini, oder Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe oder verschiedene Baum-, Nuss- und Weinspecies.



Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet wie beispielsweise *C. elegans*.

Bevorzugt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren, die öffentlich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind.

Zur Verwendung in *E. coli* Bakterien sind die typischen vorteilhaften, kommerziell erhältlichen Fusions- und Expressionsvektoren pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A, die pTrc-Vektoren (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) der "pKK233-2" von CLONTECH, Palo Alto, CA und die "pET"-, und die "pBAD"-Vektor-Serien von Stratagene, La Jolla zu nennen.

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYep-Sec1 (Baldari, et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), and pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate sowie die Vektoren des "Pichia Expression Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzelleexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf9, Sf21 oder Hi5 Zellen, welche über rekombinante Baculoviren infiziert werden. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus Expressionssysteme "MaxBac 2.0 Kit" und "Insect Select System" von Invitrogen, Calsbad oder "BacPAK Baculovirus Expressionssystem" von CLONTECH, Palo Alto, CA. Insektenzellen eignen sich in besonderer Weise zur Überexpression eukaryontischer Proteine, da sie posttranslationale Modifikationen der Proteine durchführen, die in Bakterien und Hefen nicht möglich sind. Die Handhabung von Insektenzellen in Zellkultur sowie ihre Infektion zur Expression von Proteinen sind dem Fachmann bekannt und können in Analogie zu bekannten Methoden erfolgen (Luckow und Summers, Bio/Tech. 6, 1988, pp.47-55; Glover and Hames (eds) in DNA Cloning 2, A practical Approach, Expression Systems, Second Edition, Oxford University Press, 1995, 205-244).

## 25

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzen-expressionsvektoren finden sich wie obenstehend erwähnt in Bekker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721.

- 10 Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) Nature 329:840 oder Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren vi-
- 15 ralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- 20 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

Die mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformier-

25 ten Organismen werden unter dem Begriff "erfindungsgemäßer transgener Organismus" bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von NCR in einem Verfahren zur Identifizierung von Ver-

30 bindungen mit herbizider Wirkung.

Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung die folgenden Schritte:

35

i. Inkontaktbringen einer NCR mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an die NCR erlauben; und

40 ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die NCR aus i) bindet; oder

iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität der NCR aus i) reduziert oder blockiert; oder

45

iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der NCR aus i) reduziert oder blockiert.

Der Nachweis gemäß Schritt (ii) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, erfolgen. Hierbei kann entweder die Testverbindung oder das Enzym eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope, chemilumineszierende oder enzymatische Markierung. Beispiele für enzymatische Markierungen sind Meerrettich Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Luzifizerase. Die anschließende Detektion richtet sich nach der Markierung und ist dem Fachmann bekannt.

Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Throughput Screening, HTS) geeignet sind:

1. Über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11755) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an die NCR läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren so konzipiert sein, dass eine durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay"). Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an die NCR aufgebaut werden. Alternativ kann das

erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

- 5 3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung der NCR und den auf Bindung Tetsverbindung kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
- 10
- 15
- 20 4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem "Time of Flight" Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun die NCR auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschritten kann man die an die NCR zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit Inhibitoren selektieren. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
- 25
- 30
5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisiertes Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an die NCR
- 35
- 40
- 45

aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

5

Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

10

Auch besteht die Möglichkeit, über Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der NCR mittels Röntgenstrukturanalyse weitere potentielle herbizide Wirkstoffe mittels "Molecular Modelling" zu detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse

15

benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden Auswertungen dieser Messungen; die Detektion einer Bindungsstelle im Protein sowie die Vorhersage möglicher Inhibitorstrukturen sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modelling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben

20

genannten Verfahren identifizierten Verbindungen möglich.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß

25

i. eine NCR in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß eine NCR enthält, kultiviert wird;

30

ii. die NCR aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

35

iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität der NCR reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten NCR mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten NCR ermittelt wird.

40

Die NCR enthaltende Lösung kann aus dem Lysat des ursprünglichen Organismus oder des transgenen, mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismus bestehen. Falls erforderlich kann die NCR partiell oder vollständig über gängige Methoden aufgereinigt werden. Eine allgemeine Übersicht über

45

gängige Techniken zur Reinigung von Proteinen sind beispielsweise in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN

0-87969-309-6 beschrieben. Bei rekombinanter Darstellung kann eine Reinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins über nach dem Fachmann bekannten Affinitätschromatographie erfolgen. Die Aufreinigung der NCR aus menschlichem Gewebe kann  
5 beispielsweise nach dem Verfahren von Jollie et al. (Plant Physiol. 85, pp. 457-462, 1987) erfolgen.

Die für in vitro Verfahren benötigte NCR kann somit entweder mittels heterologer Expression aus einem erfindungsgemäßen, transge-  
10 nen Organismus oder aus einem Organismus, der eine NCR Aktivität enthält, isoliert werden, vorzugsweise aus einer unerwünschten Pflanze, wobei unter dem Begriff der unerwünschten Pflanze die eingangs erwähnten Spezies zu verstehen sind.

15 Zur Identifizierung von herbiziden Verbindungen wird nun die NCR mit einer Testverbindung inkubiert. Nach einer Reaktionszeit wird die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten NCR mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten NCR ermittelt. Bei Inhibition der NCR beobachtet man eine signifi-  
20 kante Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht inhibierten erfindungsgemäßen Polypeptides, wobei eine Abnahme von mindestens 10%, vorteilhaft mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50% bis hin zu einer 100% Reduktion (Blockierung) erzielt wird. Bevorzugt mindestens  
25 50% Hemmung bei Konzentrationen der Testverbindung von  $10^{-4}$  M, bevorzugt bei  $10^{-5}$  M, besonders bevorzugt von  $10^{-6}$  M bezogen auf Enzymkonzentration im mikromolaren Bereich.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der NCR kann beispielsweise über einen Aktivitätstest erfolgen, in welchem die  
30 Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) oder die Abnahme eines spezifischen Cofaktors oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

35

Beispiele für geeignete Substrate sind z.B. Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Methemerythrin, p-Benzoquinon oder 5-Hydroxy-1,4-Naphtoquinon bevorzugt Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol  
40 besonders bevorzugt Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid ganz besonders bevorzugt Kalium-Ferricyanid und für geeignete Cofaktoren NADH. Gegebenenfalls können auch Derivate der vorstehend genannten Verbindungen verwendet werden, die eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope oder  
45 chemilumineszierende Markierung.

Die für den Aktivitätstest einzusetzenden Mengen an Substrat liegen zwischen 0.5-10 mM und Mengen an NADH zwischen 0.1-5 mM bezogen auf 1-100 µg/ml Enzym.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Umsatz eines Substrates photometrisch verfolgt, angelehnt an ein von Mihara und Sato (Methods Enzymol., 52, 1978, pp. 102-108) beschriebenes Verfahren, welches auf der Reduktion von Kalium-Ferricyanid und der photometrische Messung bei 420 nm basiert.

10

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und iii) basiert, besteht aus den folgenden Schritten:

- 15 i. Herstellung eines erfindungsgemäßen transgenen Organismus;

ii. Aufbringen einer Testverbindung auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;

20

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testverbindung; und

- 25 iv. Selektion von Testverbindungen, die ein vermindertes Wachstum oder eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

30 Hierbei beträgt der Wachstumsunterschied der in Schritt iv) zur Selektion eines Inhibitors mit herbizider Wirkung mindestens 10%, vorzugsweise 20%, bevorzugt 30%, besonders bevorzugt 40% und ganz besonders bevorzugt 50%.

- 35 Der transgene Organismus ist hierbei ein Bakterium, eine Hefe, ein Pilz, eine Pflanze oder eine eukaryontische Zelllinie (aus Insekten oder Säugetieren wie z.B. Maus), bevorzugt Pflanzen, Bakterien oder Hefen, die sich mittels gängiger Techniken leicht transformieren lassen, wie *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana Tabacum* oder *Saccharomyces cerevisiae* in welchen  
40 die für ein erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Sequenz über Transformation inkorporiert wurde. Diese transgenen Organismen weisen daher eine erhöhte Toleranz gegen Verbindungen auf, welche das erfindungsgemäße Polypeptid inhibieren. *Saccharomyces cerevisiae* bietet sich hier insbesondere an, weil ihr Genom vollständig  
45 sequenziert ist und sie leicht zur Herstellung von "knock-out"-Mutanten verwendet werden kann und das in diesem Organismus

vorhandene analoge NCR-Gen gezielt ausgeschaltet werden kann (z.B. Methods in Yeast Genetics, Kaiser, Michaelis, Mitchell (eds.) CSHL Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 73-85).

5

Die vorstehend genannte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jedoch auch zur Identifizierung von Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung verwendet werden. Hierbei wird als transgener Organismus eine Pflanze eingesetzt. Das Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung umfasst somit die folgenden Schritte:

10

i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NCR;

15

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;

20

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und

25

iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

Hierbei werden in Schritt iv) Testverbindungen selektiert, die ein verändertes Wachstum des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

30

Unter verändertem Wachstum ist hierbei eine Hemmung des vegetativen Wachstums der Pflanzen zu verstehen, was sich insbesondere in einer Reduzierung des Längenwachstums äußern kann. Die behandelten Pflanzen weisen demgemäß einen gedrungenen Wuchs auf; außerdem ist eine dunklere Blattfärbung zu beobachten. Weiterhin ist

35

unter verändertem Wachstum auch eine zeitliche Veränderung des Reifeverlaufs, eine Heumung oder Vermehrungen seitlicher Verzweigungen der Pflanzen, eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Entwicklungsstadien, eine Erhöhung der Standfestigkeit, das

40

Wachstum größerer Mengen an Knospen, Blüten, Blättern, Früchten, Samenkörnern, Wurzeln und Knollen, eine Erhöhung des Zuckergehaltes in Pflanzen wie Zuckerrüben, Zuckerrohr sowie Zitrusfrüchten, des Proteingehaltes in Pflanzen wie Getreide oder Soja oder eine Stimulierung des Latexfluß an Gummibäumen zu verstehen. Die Detektion dieses veränderten Wachstums ist dem Fachmann bekannt.

45



Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen  
5 Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testverbindungen in verschiedene Untergruppen zu teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testverbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wieder-  
10 holt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch eine ge-  
15 ringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.

Alle oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider Wirkung werden im folgenden als "erfindungsgemäße Verfahren" bezeichnet.  
20

Sämtliche, über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen oder Substanzen können anschließend auf ihre herbizide Wirkung in vivo überprüft werden. Eine Möglichkeit zur Prüfung der Verbindungen auf herbizide Wirkung ist die Verwendung  
25 der Wasserlinse *Lemna minor* in Mikrotiterplatten. Als Parameter können Veränderungen des Chlorophyllgehalts und die Photosyntheseleistung gemessen werden. Es ist auch möglich, die Verbindung auf unerwünschte Pflanzen direkt zu applizieren, wobei die herbizide Wirkung z.B. über eingeschränktes Wachstum festgestellt werden kann.  
30

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch vorteilhaft in Hochdurchsatzverfahren, sog. HTS durchgeführt werden, welches das  
35 parallele Testen einer Vielzahl verschiedener Verbindungen ermöglicht.

Im HTS bietet sich für die praktische Durchführung die Verwendung von Trägern an, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, einen oder mehrere die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthaltenden Vektoren, einen oder mehrere  
40 transgene Organismen, welche mindestens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten oder eines oder mehrere (Poly)peptide codiert über die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Der verwendete Träger kann fest oder flüssig  
45 sein, ist bevorzugt fest, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte. Die vorstehend genannten Träger sind ebenfalls Gegenstand

der vorliegenden Erfindung. Gemäß der am weit verbreitetsten Technik werden 96-well, 384-well und 1536 well Mikrotiterplatten verwendet, die in der Regel Volumina von 200 µl umfassen können. Neben den Mikrotiterplatten sind die weiteren Bestandteile eines

5 HTS-Systems passend zu den entsprechenden Mikrotiterplatten wie viele Instrumente, Materialien, automatische Pipettiervorrichtungen, Robotoren, automatisierte Plattenleser sowie Plattenwascher kommerziell erhältlich.

10 Neben den auf Mikrotiterplatten basierenden HTS-Verfahren können auch sogenannte "free format assays" oder Testsysteme, die zwischen den Proben keine physischen Barrieren aufweisen, verwendet werden wie z.B. in Jayaickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci

U.S.A. 19 (1994) 161418; Chelsky, "Strategies for Screening Com-

15 binatorial Libraries, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995); Salmon et al., Molecular Diversity 2 (1996), 5763 und US 5,976,813.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 500 g/mol, bevorzugt kleiner 400

25 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 300 g/mol. Verbindungen mit herbizider Wirkung weisen einem Ki-Wert kleiner 1 mM, bevorzugt kleiner 1 µM, besonders bevorzugt kleiner 0,1 µM ganz besonders bevorzugt kleiner 0,01 µM aufweisen.

30 Die selektierte Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen. Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wir-

35 kung der selektierte Verbindungen nicht negativ beeinträchtigen.

Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte α-Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine Enantiomere oder, sofern sie

40 chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten

45 von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann

bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3<sup>rd</sup> Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die selektierte Verbindungen können auch aus umfangreichen Substanzbibliotheken stammen.

5

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 10 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, unter Umständen auch zur Defoliation, 5 beispielsweise von Kartoffeln, oder Desikkation, beispielsweise von Baumwolle, sowie als Wachstumsregulatoren verwendet werden. Herbizide Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen 20 nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandsmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schädipflanzen verwendet werden.

25

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende herbizide Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden. 30 In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus var. napo- 35 brassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum, 40 (Gossypium arboreum, Gossypium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum 45 (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, Prunus avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre,

## 35

Ricinus communis, Saccharum officinarum, Secale cereale, Solanum tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare), Theobroma cacao, Trifolium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba, Vitis vinifera, Zea mays.

5

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kulturen, die durch Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden. Die Herstellung dieser Kulturen wird weiter unten beschrieben.

10

Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits erwähnten herbiziden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man selektierten Verbindungen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln formuliert.

15

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt versprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hochprozentigen wässrigen, öligen oder sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten,

20

Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Vernebeln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollte in jedem Fall mög-

25

lichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen gewährleisten. Die herbiziden Zusammensetzung enthalten eine herbizid wirksame Menge mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von herbiziden Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

30

Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhaltigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) können die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfs-

35

stoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es können aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgier-

40

bare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzentrate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wettable) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw.

45

Granulate oder Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder

eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhinderenden Überzug ("coating") versehen werden.

Prinzipiell sind unter dem Begriff "Hilfsmittel" folgende Verbindungsklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netzmittel, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

10 SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Verbindungen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden.

20 Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate),

25 Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587,

US 5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, 30 Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.

35

Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl,

40 ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol,

45 Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeenerde, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Dibutyl-naphthalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsulfonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fettalkoholglykoether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naphthalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooctyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyglykoether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fettalkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Polyoxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenalkylether, Laurylalkoholpolyglykoetheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

Die Applikation der herbiziden Zusammensetzungen bzw. der selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachaufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf die Blätter der runter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

45

Allgemeine DNA-Manipulations- und Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

Pflanzenmolekularbiologische Standardverfahren sowie Pflanzentransformationsverfahren sind beschrieben in Schultz et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1998), Reither et al., Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Press (1992) und Arabidopsis: A Laboratory Manual (2001), ISBN 0-87969-573-0.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli* DH5 $\alpha$ , XL-1 blue, XL10 Gold, BL21DE(3), JM 109) wurden von Stratagene, BRL Gibco oder Invitrogen, Carlsberg, CA bezogen. Zur Klonierung wurden die Vektoren pCR T7CT TOPO, pCR T7/NT TOPO und pCR 2.1 TOPO der Firma Invitrogen und pUC 19 der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg), pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66, 1990, 221-230) und pMALc2x (New England Biolabs) verwendet.

Beispiel 1: Erzeugung eines Arabidopsis-Pflanzentransformationsvektors

Aus einer cDNA Sequenz, kodierend für NCR aus *Arabidopsis thaliana* (Accession Nummer AB007799; Mizutani, M. and Fukuchi-Mizutani, M., 1997) wurden das Primerpaar Rei 156/Rei 157

Rei 156: 5'-TATACCCGGGATGGATACCGAGTTTCTCCGAA-3' und

Rei 157: 5'-TATACCCGGGGAAGTGAATTGCATCTCCGGA-3'

abgeleitet. Im Anschluss wurden die Primer Rei 156/157 in einer PCR-Reaktion zur Amplifikation eines cDNA Fragment aus einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bibliothek (Stratagene) verwendet. Die PCR wurde nach den in Tabelle 1 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 1

39

5	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl der Zyklen
	95	300	1
	95	60	34
	58	90	
	72	300	
	72	600	1

10 Nach Reinigung über Agarose-Gelelektrophorese wurde das erhaltene Fragment (SEQ ID NO:1) nach Herstellerangaben in den Vektor pPCRScripT kloniert (pPCRScripT-NCR). Durch Sequenzierung konnte die Identität des Arabidopsis NCR cDNA Klons in voller Länge bestätigt werden.

15 Der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer 1990, Plant Science 66, 221-230) wurde mit SmaI gespalten und mit dem aus dem Vektor pPCRScripT-NCR über SmaI isolierten NCR Fragment ligiert (pBinAR-NCR). Der Ligationsansatz wurde in XL10 Gold E. coli Zellen transformiert und pBinAR-NCR enthaltende Klone über eine Digoxigenin-markierte NCR-Sonde (Roche) mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern identifiziert. Der Nachweis der Antisense Orientierung der NCR-cDNA in pBinAR-NCR erfolgte durch Sequenzierung sowie über PCR-Reaktionen mit 2 verschiedenen Primerpaaren (Rei 143 und Rei 196, bzw. Rei 144 und Rei 195) nach den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 2

30	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklennanzahl
	95	120	1
	95	60	34
	58	60	
	72	120	
	72	300	1

Die Antisense-Orientierung der NCR konnte mit den Primern

Rei 143: 5'-GCTATGACCATGATTACGCC-3' und

Rei 196: 5'-TGAGACATCCGTCCTTGC-3'

konnte über das Entstehen eines 740bp langen DNA-Fragments und mit den Primern

Rei 144: 5'-ACGTTGTAAACGACGGCCA-3' und



Rei 195: 5'-CCGACTACGTTAGACTCTG-3'

über das Entstehen eines 885bp langen DNA-Fragments nachgewiesen werden.

5

#### Beispiel 2: Transformation und Analyse von Arabidopsispflanzen

Das Konstrukt pBinAR-NCR wurde in Agrobakterienstamm pGV 2260 transformiert. Zur Transformation von Arabidopsispflanzen wurde  
10 eine positiv transformierte Agrobakterienkolonie eingesetzt. Der Nachweis der Anwesenheit des Konstrukts pBinAR-NCR in einer Agrobakterienkolonie wurde über PCR mit den Primern Rei 156 und Rei 157 über PCR nach den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen. Als DNA-Template diente eine direkt von der Agarplatte entnommenen  
5 Menge einer Agrobakterienkolonie.

Von einer einzelnen Kolonie positiv transformierter Agrobakterien auf einer Platte wurde eine 4 ml LB-Medium Kultur (LB-Medium: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefe Extrakt, 10 g/l NaCl; pH 7.0; 80 mg/l Kanamycin/l und 25 mg/l Rifampicin) inokuliert, über Nacht bei 28°C  
20 inkubiert. Im Anschluß wurde mit dieser Kultur eine 400 ml LB-Medium Kultur (LB-Medium mit 80 mg Kanamycin/ml und 25 mg/ml Rifampicin) inokuliert. Nach 12 stündiger Inkubation bei 28°C und 220 rpm wurde die Kultur präzipitiert (8.000 rpm, 20 min.) und in  
25 Transformationsmedium resuspendiert (1/2 MS-Media nach Murashige T. und Skoog F. 1962. Physiologia Plantarum. 15: 473-497; Owen H.R. and Miller A.R. 1992. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 147-150; 0,5g/l 2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid), pH 5,8; 50 g/l Saccharose). In die erhaltene Suspension wurden blü-  
30 tentragende Arabidopsispflanzen dreimal jeweils im Abstand von 2,5 Tagen ca. 5-mal hineingetaucht und anschließend in Töpfe mit feuchter Erde überführt. Nach 6 Wochen Inkubation unter Langtag-  
bedingungen in Klimakammern (Tagsüber 22-24°C, Nachts 19°C; 65% relative Luftfeuchtigkeit) wurden die Samen der Pflanzen geerntet.  
35

#### Beispiel 3: Analyse der transgenen Pflanzen

Zur Analyse werden Samen der transformierten Pflanzen aus Beispiel 2 auf Agar-Selektionsplatten (2,15 g/l Murashige+Skoog micro and macro elements (Fa. DUCHEFA; nach Murashige T. und Skoog F. 1962. Physiologia Plantarum. 15: 473-497; Owen H.R.; Miller A.R. 1992. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 147-150) 0,1 g/l Myo-Inositol, 0,5 g/l MES, 10 g/l Saccharose, pH 5.7, 1ml Gew.-% Vitamin B5, 50µg/l Kanamycin; 15g/l Agar Agar).  
45

## 41

Auf den Selektionsplatten gewachsene Pflanzen wurden nach 3 - 4 Wochen auf Erde gesetzt und 4 - 8 Wochen bei Langtagbedingungen in Klimakammern inkubiert (Tagsüber 22-24°C, Nachts 19°C; 65% relative Luftfeuchtigkeit). Die Samen wurden nach 6 Wochen geerntet. Die Integration des Antisense-NCR-Gens in das Genom der transgenen Pflanzen wurde über PCR nach den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen verifiziert.

Tabelle 3

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklennanzahl
95	120	1
95	60	34
45-50	60	
72	120	
72	300	1

Als Template diente genomische DNA (Isolation mittels des "DNeasy Plant Mini "-Kits von QIAGEN nach Herstellerangaben), die aus Blattmaterial der entsprechenden transgenen Linien präpariert wurde. Als Positivkontrolle diente das zur Transformation verwendete NCR-Antisense-pBinAR-Konstrukt. Durch gezielte Wahl der Primer konnten sowohl das intrinsische genomische Gen, welches ein Intron enthält und somit länger ist als die Antisense-NCR-cDNA, als auch die Antisense-NCR-cDNA selbst nachgewiesen werden. Bei Anwesenheit der Antisense-NCR-cDNA im Genom der transgenen Pflanzen betragen die erwarteten Fragmentlänge für die genomische NCR (mit einem Intron) ca. 1800bp bei Verwendung der Primer

Rei 524: 5'-TTCGTTGCTTTCGTCGCCGTT-3' und

Rei 525: 5'-GTTTGCAGCCATGGCCTTGTT-3'

sowie 750bp für die Antisense-NCR-cDNA bei Verwendung der Primer

Rei 524: 5'-TTCGTTGCTTTCGTCGCCGTT-3' und

Rei 527: 5'- GGCGGGAACGACAATCTGATC-3'.

40

Transgene Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR-NCR Antisense enthielten, wiesen hohe Anthocyaninanhäufungen, also stark gestresste Blätter und Adern, chlorotische Blätter sowie eine drastische Wachstumsverzögerung auf: So hatten Transgene Pflanzen (TO-Generation) nur 1-10% der Frischmasse von Wildtyppflanzen nach 6 Wochen Kultivierung auf Erde bei Langtagbedingungen in Klimakammern (Tagsüber 22-24°C, Nachts 19°C; 65% relative Luftfeuchtigkeit. Die

Samen, die sich in den Schoten der Pflanzen der transformierten TO-Generation entwickelten, waren verkümmert und keimten in 100% aller Fälle nicht.

- 5 Hiermit wurde erstmalig und überraschend gezeigt, dass die natürliche Expression von für NCR codierenden Sequenzen essenziell für Pflanzen ist und eine verringerte Expression zu Schädigungen entsprechend den vorstehend genannten Phänotypen führt. Somit konnte  
10 gezeigt werden, dass sich NCR als Herbizidtarget eignet.

#### Beispiel 4: Expression in E.coli

- 5 Zur Erzeugung aktiven Proteins mit pflanzlicher NCR-Aktivität wurde eine cDNA aus Arabidopsis codierend für eine NCR (Genbank Accession Nummer: AB007799) in E. coli Bakterien überexprimiert. Hierfür wurde die für NCR kodierende Nukleinsäuresequenz nach Standardbedingungen via PCR (z.B. nach Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; 34 Zyklen; Annealingtemperatur 60°C; Polymerisationszeit 2 min) mit pBinAR-NCR als Template und den Primern  
20

Rei 153: 5'- TATAGAATTCATGGATACCGAGTTTCTCCGAA-3' (EcoRI)

- 25 Rei 483: 5'- TATACTGCAGTCAGAACTGGAATTGCATCTCCGG-3' (PstI)

- enthaltend die Restriktionsenzymsteststellen EcoRI und PstI amplifiziert und in den Vektor pMAL-c2x (New England Biolabs) über die Restriktionsenzymsteststellen EcoRI und PstI kloniert  
30 (pMAL-c2x-NCR).

- Die pMAL-c2x-NCR Konstrukte wurden in E.coli-Stamm JM109 (Stratagene) transformiert und NCR nach Herstellerangaben über IPTG als  
35 Fusionsprotein mit Maltose-Binding-Protein (NCR-MBP) exprimiert. Die Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie mit einer Maltosesäule wurde wie vom Hersteller New England Biolabs beschrieben durchgeführt.

- 40 Beispiel 5: in vitro Testsysteme

- Die Aktivität der NCR wurde mit NCR, die gemäß Beispiel 4 rekombinant exprimiert wurde (Fukuchi-Mizutani et al., Plant Physiol. 119, pp. 353-361, 1999) oder nach dem von Jollie et al. (Plant  
45 Physiol. 85, pp. 457-462, 1987) beschriebenen Verfahren isoliert wurde, bestimmt nach der Methode von Mihara und Sato (Methods En-

zymol., 52, 1978, pp. 102-108).

Nach Mihara und Sato (Methods Enzymol., 52, 1978, pp. 102-108) werden 1-10µg gereinigtes NCR-MBP Protein in 100µl Puffer (100 mM 5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (zu gleichen Teilen gemischt) mit 1 mM Kalium-Ferricyanid versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,3 mM β-NADH gestartet.

10 Photometrisch gemessen wird die Reduktion von Kalium-Ferricyanid bei 420 nm und 25°C in einem Zeitraum von 5 bis 15 min gemessen.

Beispiel 6: Identifizierung eines funktionellen Analogon aus Tabak

15 Zur Erzeugung einer cDNA-Bibliothek (im folgenden "binäre cDNA-Bank" genannt) in einem Vektor, der direkt für die Transformation von Pflanzen verwendet werden kann, wurde mRNA aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert und mit dem TimeSaver cDNA Synthese Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in doppelsträngige cDNA 20 umgeschrieben. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit T<sub>12-18</sub> Oligonucleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Größenfraktionierung und Ligation von EcoRI-NotI-Adaptoren nach Herstellerangaben und Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase (Stratagene) wurde die cDNA-Population normalisiert. Hierzu wurde 25 die Methode nach Kohci et al, 1995, Plant Journal 8, 771-776 vorgegangen, wobei die cDNA durch PCR mit dem Oligonukleotid N1 unter den in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen amplifiziert wurde.

Tabelle 4

30	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklennummer
	94	300	1
	94	8	10
	52	60	
35	72	180	
	94	8	10
	50	60	
	72	180	
40	94	8	10
	48	60	
	72	180	
	72	420	1

## 44

Das erhaltene PCR-Produkt wurde an die Säulenmatrix des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) gebunden und mit 300 mM NaP-Puffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.04% SDS eluiert. Die DNA wurde 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 24  
5 Stunden bei 60°C renaturiert. 50µl der DNA wurden auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen und diese 3 Mal mit 1 ml 10 mM NaP-Puffer, pH 6.8 gewaschen. Die gebundene Einzelstrang-DNA wurde mit 130 mM NaP-Puffer, pH 6.8 eluiert, mit Ethanol gefällt und in 40µl Wasser gelöst. Hiervon wurden 20µl für eine weitere PCR-Am-  
10 plifikation wie oben beschrieben verwendet. Nach einer weiteren Anreicherung von ssDNA wurde eine dritte PCR-Amplifikation wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung des Pflanzentransformationsvektors zur Aufnahme  
15 der wie oben beschrieben hergestellten cDNA-Population erfolgte über Restriktionsenzym-Verdau des Vektor pUC18 mit SbfI und BamHI, Reinigung des Vektorfragment gefolgt von Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase und Religation mit T4 DNA Ligase (Stratagene). Das so hergestellte Konstrukt wird im folgenden als  
20 pUC18SbfI- bezeichnet.

Der Vektor pBinAR wurde zunächst mit NotI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert, mit SbfI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert und im Anschluß mit EcoRI und HindIII gespalten.  
25 Das resultierende Fragment wurde in ein Derivat des binären Pflanzentransformationsvektors pPZP (Hajdukiewicz, P, Svab, Z, Maliga, P., (1994) Plant Mol Biol 25:989-994) ligiert, der eine Transformation von Pflanzen mittels Agrobakterium ermöglicht und eine Kanamycinresistenz in transgenen Pflanzen vermittelt, li-  
30 giert. Das hierbei erzeugte Konstrukt wird im folgenden als pSun12/35S bezeichnet.

pUC18SbfI- wurde als Template für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den Oligonucleotiden V1 und V2 (siehe Tabelle 3) und  
35 Pfu DNA Polymerase eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde in den mit SmaI gespalten pSun12/35S ligiert, wodurch pSunblues2 erzeugt wurde. Nach Spaltung mit NotI, Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) und Aufreinigung des Vektorfragmentes wurde pSunblues2 mit der norma-  
40 lisierten und ebenfalls mit NotI gespaltenen cDNA Population ligiert. Nach Transformation in E.coli X1-1blue (Stratagene) wurden die so erzeugte Klone in Mikrotiterplatten abgelegt. Die binäre cDNA-Bank enthält cDNAs in "Sense"- und in "Antisense"-Orientierung unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus 35s Promotors, die  
45 dementsprechend nach der Transformation in Tabakpflanzen zu "Co-suppressions"- und "Antisense"-Effekten führen können.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleinsäuresequenz
N1	5'-AGAATTCGCGGCCGCT-3'
5 V1 (PWL93not)	5'-CTCATGCGGCCGCGCGCAACGCAATTAATGTG-3'
V2 (pWL92)	5'-TCATGCGGCCGCGAGATCCAGTTCGATGTAAC-3'
G1 (35S)	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3'
G2 (OCS)	5'-GTAAGGATCTGAGCTACACAT-3'

- 10 Die Identifizierung einer für NCR kodierenden Sequenz erfolgte über eine Digoxigenin markierte Sonde hergestellt über den DIG DNA Labeling Mix (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben, wobei das Plasmid pMAL-c2x-NCR unter Standardbedingungen über PCR mit
- 15 den Primern

Rei 111: 5'-ATGGATACCGAGTTTCTCCGAA-3' und

Rei 222: 5'- AACTGGAATTGCATCTCCGGA-3'

- 20 amplifiziert wurde. Die so hergestellte Sonde wurde zur Durchmusterung der cDNA Bank aus *Nicotiana tabacum* eingesetzt. Die cDNA Bank wurde mit einem Titer von  $2,5 \times 10^5$  Plaque bildenden Einheiten ausplattiert und mit Hilfe der Plaque-Durchmusterungsmethode analysiert (T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989). Es wurden 12 Phagenpopulationen isoliert, mit denen eine zweite Durchmusterung durchgeführt wurde, wodurch genetisch einheitlich Phagen-Populationen isoliert werden
- 25 konnten, die zur in vivo Excision verwendet wurden. Durch Restriktionsanalyse konnten keine Unterschiede zwischen den cDNA Klonen festgestellt werden und es wurden vier Klone mit den größten Insertionen zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten dieser Klone ergaben die SEQ ID NO:3, die mit der SEQ ID NO:1 zu
- 30 77% identisch ist.
- 35

## Patentansprüche

1. Verwendung von einem Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- c) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt; oder
- d) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1.
- als Targets für Herbizide.
2. Pflanzliche Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase enthaltend einen Teilbereich umfassend:
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 77% zu der SEQ ID NO:3;

## 2

- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

3. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase als Target für Herbizide kodiert von einem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2.

4. Verfahren zur Detektion funktioneller Analoga der SEQ ID NO:1

- a) durch Herstellung einer Sonde gefolgt von anschließenden Durchsuchen einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Spezies; oder
- b) einer Computer-Recherche nach analogen Sequenzen in elektronischen Datenbanken.

5. Expressionskassette umfassend

- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2; oder
- b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- c) eine Kombination aus a) und b).

6. Vektor umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 5.

7. Nicht humaner transgener Organismus umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase gemäß Anspruch 2, eine Expressionskassette gemäß Anspruch 5 oder einen Vektor gemäß Anspruch 6 ausgewählt aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen.

8. Verwendung eines Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz enthaltend

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder



b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

5

c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1;

10

d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt.

15

in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung.

9. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:

20

i. Inkontaktbringen eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

25

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz;

b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt;

30

c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder

35

d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt

40

mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase erlauben; und

45

4

ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus i) bindet; oder

5 iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus i) reduziert oder blockiert; oder

10 iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus i) reduziert oder blockiert.

10. Verfahren nach den Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass

15 i. NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase, die durch eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

20 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

25 c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder

30 d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt

35 kodiert wird, entweder in einem transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase enthält, kultiviert wird;

40 ii. die NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

## 5

iii. eine Testverbindung selektiert wird, welche die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase aus Schritt i) reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase verglichen wird.

5

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt iii) die Aktivität der NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase photometrisch über den Einsatz von Ferricytochrom b5, Kalium-Ferricyanid, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Methemerythrin, p-Benzoquinon oder 5-Hydroxy-1,4-Naphtoquinon als Substrat bestimmt wird.

10

15

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

20

i. Herstellung eines transgenen Organismus nach Anspruch 7 oder eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bestehend aus

25

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

30

b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt;

35

c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder

40

d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten läßt

45

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf den transgenen Organismus nach Anspruch i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;

## 6

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testsubstanz; und

5 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein vermindertes Wachstum oder eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus.

10 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem pflanzlichen Organismus oder einer Hefe durchgeführt wird.

15 14. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

20 i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase bestehend aus

25 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;

30 c) einem funktionellen Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 52% zu der SEQ ID NO:1; oder

35 d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 39% aufweist, ableiten lässt

40 ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und

- 5 e) Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

10 15. Träger, der eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 2, oder eine oder mehrere Expressionskassetten nach Anspruch 5, einen oder mehrere Vektoren nach Anspruch 6, einen oder mehrere Organismen nach Anspruch 7 oder eines oder mehrere (Poly)peptide nach Anspruch 3 aufweist.

15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird.

20 17. Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 13 und 16.

18. Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über das Verfahren nach den Ansprüchen 14 und 16.

25 19. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man

30 a) eine Verbindung mit herbizider Wirkung über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 13 und 16 oder eine Verbindung mit wachstumsregulatorischer Wirkung nach den Ansprüchen 14 und 16 identifiziert; und

35 b) diese Verbindung zusammen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung formuliert.

40 20. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Verbindung nach Anspruch 17 oder 18 oder eine Zusammensetzung erhältlich über das in Anspruch 19 genannte Verfahren auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.

45 21. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 17 oder 18 oder einer agrochemischen Formulierung erhältlich über das in Anspruch 19 genannte Verfahren in einem Verfahren nach Anspruch

8

20 zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder  
zur Regulation des Wachstums von Pflanzen.

5

10

5

20

25

0

35

40

45

## NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase als Target für Herbizide

## Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase (E.C. 1.6.2.2), welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt, und

10 durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 oder funktionelle Äquivalente der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz codiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1 bereitgestellt. Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung des Polypeptides

5 mit der biologischen Aktivität einer NADH-abhängigen Cytochrom b5 Reduktase in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung, welche NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase inhibieren. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als

20 Herbizide.

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

<120> NADH-abhängige Cytochrom b5 Reduktase als Target für  
Herbizide

&lt;130&gt; 20020408

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 846

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(843)

&lt;400&gt; 1

atg gat acc gag ttt ctc cga acc cta gat cgt cag att ctt ttg ggt	48
Met Asp Thr Glu Phe Leu Arg Thr Leu Asp Arg Gln Ile Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
gtc ttc gtt gct ttc gtc gcc gtt ggt gct ggt gct gct tat ttt ctt	96
Val Phe Val Ala Phe Val Ala Val Gly Ala Gly Ala Ala Tyr Phe Leu	
20 25 30	
aca tcc tcc aag aaa cgc aga gtg tgt ttg gat cca gag aat ttc aag	144
Thr Ser Ser Lys Lys Arg Arg Val Cys Leu Asp Pro Glu Asn Phe Lys	
35 40 45	
gag ttc aag ctt gtt aag aga cat cag ctt agt cac aat gtg gcc aag	192
Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg His Gln Leu Ser His Asn Val Ala Lys	
50 55 60	
ttc gtt ttt gaa ctc cca act tct act tct gtg ttg ggt ctt ccc att	240
Phe Val Phe Glu Leu Pro Thr Ser Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile	
65 70 75 80	
gga caa cac atc agt tgc agg gga aag gat ggt caa gga gag gat gtt	288
Gly Gln His Ile Ser Cys Arg Gly Lys Asp Gly Gln Gly Glu Asp Val	
85 90 95	
att aag cca tac acc ccg act acg tta gac tct gac gtt gga cgt ttc	336
Ile Lys Pro Tyr Thr Pro Thr Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Arg Phe	
100 105 110	
gaa ctt gtc att aag atg tat ccg caa gga cgg atg tct cat cat ttc	384
Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe	
115 120 125	



2

agg gag atg cgt gtt gga gac cat ctt gcc gta aag gga cca aag ggt 432  
 Arg Glu Met Arg Val Gly Asp His Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly  
 130 135 140

agg ttc aag tat caa cca ggt cag ttt agg gca ttt gga atg ctt gct 480  
 Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly Gln Phe Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala  
 145 150 155 160

gga ggt tca ggc atc act ccc atg ttc caa gtg gcc aga gca att cta 528  
 Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu  
 165 170 175

gaa aac cca aca gac aag aca aag gtg cat ctc att tac gcc aac gtc 576  
 Glu Asn Pro Thr Asp Lys Thr Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val  
 180 185 190

gaa tac gac gac att ctc ttg aag gaa gaa ttg gag ggt ctt act acc 624  
 Tyr Asp Asp Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Glu Gly Leu Thr Thr  
 195 200 205

aat tac cct gaa caa ttt aaa atc ttc tat gtt ttg aac cag cct ccg 672  
 Asn Tyr Pro Glu Gln Phe Lys Ile Phe Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro  
 210 215 220

gaa gta tgg gat ggt ggt gtt gga ttt gta tca aag gaa atg att cag 720  
 Glu Val Trp Asp Gly Gly Val Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln  
 225 230 235 240

act cat tgc cct gca cct gca tct gat att cag atc cta aga tgc gga 768  
 Thr His Cys Pro Ala Pro Ala Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly  
 245 250 255

cca ccg cca atg aac aag gcc atg gct gca aac ctt gaa gct ctg gga 816  
 Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala Met Ala Ala Asn Leu Glu Ala Leu Gly  
 260 265 270

tac tct ccg gag atg caa ttc cag ttc tga 846  
 Tyr Ser Pro Glu Met Gln Phe Gln Phe  
 275 280

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 281

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 2

Met Asp Thr Glu Phe Leu Arg Thr Leu Asp Arg Gln Ile Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Val Phe Val Ala Phe Val Ala Val Gly Ala Gly Ala Ala Tyr Phe Leu  
 20 25 30

Thr Ser Ser Lys Lys Arg Arg Val Cys Leu Asp Pro Glu Asn Phe Lys  
 35 40 45

3

Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg His Gln Leu Ser His Asn Val Ala Lys  
 50 55 60

Phe Val Phe Glu Leu Pro Thr Ser Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile  
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Ser Cys Arg Gly Lys Asp Gly Gln Gly Glu Asp Val  
 85 90 95

Ile Lys Pro Tyr Thr Pro Thr Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Arg Phe  
 100 105 110

Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe  
 115 120 125

Arg Glu Met Arg Val Gly Asp His Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly  
 130 135 140

Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly Gln Phe Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala  
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu  
 165 170 175

Glu Asn Pro Thr Asp Lys Thr Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val  
 180 185 190

Thr Tyr Asp Asp Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Glu Gly Leu Thr Thr  
 195 200 205

Asn Tyr Pro Glu Gln Phe Lys Ile Phe Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro  
 210 215 220

Glu Val Trp Asp Gly Gly Val Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln  
 225 230 235 240

Thr His Cys Pro Ala Pro Ala Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly  
 245 250 255

Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala Met Ala Ala Asn Leu Glu Ala Leu Gly  
 260 265 270

Tyr Ser Pro Glu Met Gln Phe Gln Phe  
 275 280

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 729

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nicotiana tabacum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(726)

&lt;400&gt; 3

gta tgc ttg gat cct gag agg ttc aag gaa ttt aag ctt gtg aag cgt 48

Val Cys Leu Asp Pro Glu Arg Phe Lys Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg  
 1 5 10 15

aca caa ata agc cac aat gtt gca aag ttc aga ttt gaa ctc ccc aca 96  
 Thr Gln Ile Ser His Asn Val Ala Lys Phe Arg Phe Glu Leu Pro Thr

20 25 30

cct act tct gta ttg ggc cta ccc att gga caa cat att agt tgc agg 144  
 Pro Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile Gly Gln His Ile Ser Cys Arg

35 40 45

ggc aag gat agt caa ggt gaa gag gtt gtt aaa ccg tac aca cca act 192  
 Gly Lys Asp Ser Gln Gly Glu Glu Val Val Lys Pro Tyr Thr Pro Thr

50 55 60

act ttg gat tca gat gtt gga tat ttt gaa cta gtt att aag atg tat 240  
 Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr

65 70 75 80

cct caa gga agg atg tct cat cat ttc cga gaa atg cgt gag ggt gat 288  
 Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe Arg Glu Met Arg Glu Gly Asp

85 90 95

tat ttg gct gtg aag gga cct aag ggc cgc ttt aag tac cag cct ggc 336  
 Tyr Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly

100 105 110

caa gtg aga gca ttt gga atg ctt gct gga ggc tct ggc att acc cca 384  
 Gln Val Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro

115 120 125

atg ttt cag gtt gct aga gct att ctc gaa aat cca aat gac aag aca 432  
 Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu Glu Asn Pro Asn Asp Lys Thr

130 135 140

gtg cac ttg ata tat gct aat gtt acc tat gaa gac ata ctt tta 480  
 Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val Thr Tyr Glu Asp Ile Leu Leu

145 150 155 160

aag gaa cag ttg gat ggc ctt gct gct aac tat cct gac cgt ttc aaa 528  
 Lys Glu Gln Leu Asp Gly Leu Ala Ala Asn Tyr Pro Asp Arg Phe Lys

165 170 175

att tat tac gta ctg aat cag cct cct gaa gta tgg agc ggt ggt gtt 576  
 Ile Tyr Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro Glu Val Trp Ser Gly Gly Val

180 185 190

gga ttt gtg tcc aag gaa atg att cag act cat tgt cct gcc ccg gca 624  
 Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln Thr His Cys Pro Ala Pro Ala

195 200 205

tct gac att cag ata ctg agg tgt ggt cca cct cca atg aac aag gct 672  
 Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala

210 215 220

5

atg gct gct cat ctt gaa gcc ctt gga tac acc cca gag atg caa ttc 720  
Met Ala Ala His Leu Glu Ala Leu Gly Tyr Thr Pro Glu Met Gln Phe  
225 230 235 240

cag ttt taa 729  
Gln Phe

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nicotiana tabacum

&lt;400&gt; 4

Val Cys Leu Asp Pro Glu Arg Phe Lys Glu Phe Lys Leu Val Lys Arg  
1 5 10 15

Thr Gln Ile Ser His Asn Val Ala Lys Phe Arg Phe Glu Leu Pro Thr  
20 25 30

Pro Thr Ser Val Leu Gly Leu Pro Ile Gly Gln His Ile Ser Cys Arg  
35 40 45

Gly Lys Asp Ser Gln Gly Glu Glu Val Val Lys Pro Tyr Thr Pro Thr  
50 55 60

Thr Leu Asp Ser Asp Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Ile Lys Met Tyr  
65 70 75 80

Pro Gln Gly Arg Met Ser His His Phe Arg Glu Met Arg Glu Gly Asp  
85 90 95

Tyr Leu Ala Val Lys Gly Pro Lys Gly Arg Phe Lys Tyr Gln Pro Gly  
100 105 110

Gln Val Arg Ala Phe Gly Met Leu Ala Gly Gly Ser Gly Ile Thr Pro  
115 120 125

Met Phe Gln Val Ala Arg Ala Ile Leu Glu Asn Pro Asn Asp Lys Thr  
130 135 140

Lys Val His Leu Ile Tyr Ala Asn Val Thr Tyr Glu Asp Ile Leu Leu  
145 150 155 160

Lys Glu Gln Leu Asp Gly Leu Ala Ala Asn Tyr Pro Asp Arg Phe Lys  
165 170 175

Ile Tyr Tyr Val Leu Asn Gln Pro Pro Glu Val Trp Ser Gly Gly Val  
180 185 190

Gly Phe Val Ser Lys Glu Met Ile Gln Thr His Cys Pro Ala Pro Ala  
195 200 205

Ser Asp Ile Gln Ile Leu Arg Cys Gly Pro Pro Pro Met Asn Lys Ala  
210 215 220

BASF Aktiengesellschaft 20020408

PF 53755 DE

6

Met	Ala	Ala	His	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Tyr	Thr	Pro	Glu	Met	Gln	Phe
225					230					235					240

Gln Phe